

XP-002081248

1/1 - (C) WPI / DERWENT
AN - 88-253361 ç36!
AP - JP870155679 870622; JP870155679 870622; çPrevious
Publ. J63183502 !
PR - JP860208950 860904; JP870155679 870622
TI - Inactivating agent for viruses - contg.
poly:hexyl:biguanide or its salts, to inactivate e.g.
herpes virus, pox virus etc.
IW - INACTIVATE AGENT VIRUS CONTAIN POLY HEXYL BIGUANIDE
SALT INACTIVATE HERPES VIRUS POX VIRUS
PA - (UENS) UENO SEIYAKU OYO KENKYUSHO KK
PN - JP63183502 A 870622 DW8836 007pp
- JP2544388B2 B2 961016 DW9646 A01N47/44 007pp
ORD - 1987-06-22
IC - A01N47/44 ; A61K31/78 ; A61K31/785
FS - CPI
DC - B04 C03
AB - J63183502 The novel inactivating agent for viruses
contains an active ingredient of polyhexabiguanide
which has repeating unit of formula (I) and mean
mol.wt. of about 700-1300, or its salts.
- As salts of polyhexabiguanide, inorganic salts, e.g. ,
sulphate, nitrate, or organic salts, e.g. lactate,
tartrate, maleate, malonate, and gluconate, are used.
The form of the agent is not limited to any kind, but
the agent may usually be formed into an aq. agent using
water, or organic solvent, e.g. aliphatic alcohol,
glycol, glycolether, or into powder agent using kaolin,
talc, diatom earth, bentonite, calcium carbonate, etc.
- USE/ADVANTAGE - The agent may be applied to human,
animals, e.g. fowls, cows, pigs, etc., or sheds for
animals and appts. to inactivate viruses. It is partic.
useful to inactivate herpesvirus, coronavirus,
reovirus, poxvirus and paramyxovirus.(0/0)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-183502

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)7月28日

A 01 N 47/44
A 61 K 31/785

ADY

8519-4H
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ウイルス不活化剤

⑯ 特 願 昭62-155679

⑰ 出 願 昭62(1987)6月22日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)9月4日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-208950

㉑ 発 明 者 上 野 隆 三 兵庫県西宮市南郷町10-27
㉒ 発 明 者 上 野 隆 司 京都府京都市左京区下鴨宮崎町2-23
㉓ 発 明 者 畑 中 和 憲 大阪府藤井寺市西小室1-40-2
㉔ 発 明 者 久 能 祐 子 大阪府茨木市上泉町6-8 ローゼンハイム312
㉕ 出 願 人 株式会社 上野製薬応 大阪府大阪市東区高麗橋2丁目31番地
用研究所
㉖ 代 理 人 弁理士 青 山 蓑 外2名

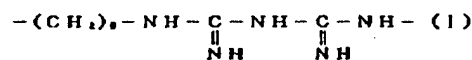
明 細 書

1. 発明の名称

ウイルス不活化剤

2. 特許請求の範囲

1. 式(1):



で表わされる繰返し単位を有する平均分子量約700~1300のポリヘキサメチレンバイガナジンまたはその塩を有効成分とするウイルス不活化剤。

2. ポリヘキサメチレンバイガナジンの平均分子量が900~1100である第1項記載の不活化剤。

3. ウイルスが畜産動物疾患原因ウイルスである第1項記載の不活化剤。

4. ウイルスがヘルペスウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、ポックスウイルスまたはパラミクソウイルスである第1項記載の不活化剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒトおよび動物に無害の疾患原因ウイルスの不活化剤に関する。

従来の技術

および

発明が解決しようとする問題点

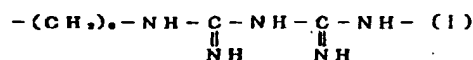
ウイルスが原因となるヒトや動物の疾病は種々のものが知られているが、これらがいったん発生した場合、有効な治療法はないとされている。従って、多くの場合、ウイルス性疾患の予防のため、ヒトや動物に対しワクチンの接種が行われている。しかしながら、ワクチンの接種だけでは、必ずしも十分な予防とは言えず、外環境からのウイルスの感染経路を断つためにヒト、動物、家畜舎あるいは使用する器具の洗浄・消毒、さらに作業員の衣服あるいは手・足の洗浄・消毒が行われているのが実情であって、ヒトや動物のウイルス性疾患の原因ウイルスに対して有効な不活化剤は見出されていない。

本発明は、このような事情に鑑み、一般細菌に

対して抗菌力を有する(特公昭55-42611号公報および特開昭59-101425号公報参照)、自体公知の化合物(米国特許第2643232号および同第3428576号各明細書参照)であるポリヘキサメチレンバイガナジンあるいはその塩が、ヒトと動物のウイルス性疾患の原因ウイルスに対して優れた不活化作用を有するという知見に基づいてなされたものである。

問題点を解決するための手段

即ち本発明は、式(1)：



で表わされる繰返し単位を有する平均分子量約700～1300のポリヘキサメチレンバイガナジンまたはその塩を有効成分とするウイルス不活化剤に関する。

ポリヘキサメチレンバイガナジンの平均分子量は約700～1300、好ましくは900～1100である。

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩としては、

-3-

可能である。

このような溶液剤または粉剤は畜産動物、家畜舎、これらに使用する用具や器材または作業員の衣服や手袋等へ直接噴霧もしくは散布して使用するのが一般的であり、さらに溶液剤の場合には、洗浄液等として使用してもよい。このような処理によって、ヒトや動物、家畜舎および用具や器材等に存在するウイルスを不活化することができ、外環境からのウイルス感染を防止しうる。

本発明によるウイルス不活化剤の使用量は、特に限定的ではないが、通常はポリヘキサメチレンバイガナジンまたはその塩を約100～50000倍、好ましくは500～200000倍に希釈して適宜使用すればよい。例えば水溶液の場合には畜産動物の飼育期間中、毎日、家畜舎1㎡あたり1ℓ以上の不活化剤を通常1～10回程度に別けて噴霧散布もしくは洗浄を行う。

本発明の不活化剤が対象としうるウイルスとしては、鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス、マレック病ウイルス、鶏伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッ

ハロゲン化水素酸塩、硫酸塩および硝酸塩等の無機酸塩または乳酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩およびグルコン酸塩等の有機酸塩が例示される。

本発明によるポリヘキサメチレンバイガナジンまたはその塩を有効成分とするウイルス不活化剤の調製形態は特に限定的ではないが、通常は水もしくは有機溶剤、例えば脂肪族アルコール、グリコール、グリコールエーテル等を溶媒とする溶液剤または微粉末、例えばカオリン、ケイソウ土、タルク、ベントナイト、炭酸カルシウム、粉末マグネシウム等を希釈剤とする粉剤として調製される。

ポリヘキサメチレンバイガナジンまたはその塩の濃度は通常、約0.01～30重量%、好ましくは0.03～20重量%である。

本発明によるウイルス不活化剤には所望により常套の添加剤、例えば湿潤剤、分散剤、乳化剤、懸濁剤等を適宜配合してもよい。あるいは他の防カビ剤、抗菌剤、抗ウイルス剤と併用することも

-4-

スル病ウイルス、伝染性ファブリキウス囊腫ウイルス、鶏脳脊髄炎ウイルスなどの鶏の疾患原因ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、オーエスキー病ウイルス、豚バクテリウムウイルス、インフルエンザウイルスなどの豚の疾患原因ウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、新生子牛下痢症コロナウイルス、バラインフルエンザウイルス、アカバネウイルスなどの牛の疾患原因ウイルスなどが挙げられる。特に本発明の不活化剤は、ヘルペスウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、ポックスウイルスあるいはパラミクソウイルスに対して優れた不活化作用を有するので、例えば鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス、マレック病ウイルス、鶏伝染性気管支炎ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、オーエスキー病ウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、新生子牛下痢症コロナウイルス、伝染性ファブリキウス囊腫ウイルス、鶏痘ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、牛のバラインフルエンザウイルスなどに特に有効である。

以下、本発明を実施例によって説明する。

実施例 1

鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス(以下、ILTウイルスと略す)に対する効果

ポリヘキサメチレンパイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)をリン酸緩衝液で10000倍、20000倍、40000倍に希釈し、この溶液2mlにILTウイルスCE株の希釈液0.2mlを混ぜ、20℃の恒温槽中に静置し、接触後、5分、15分、30分、60分、120分経過後、その液0.1mlを組織培養した鶏腎細胞に接種した。37℃で4日間培養後、細胞変性効果を観察し、50%感染量(TCID₅₀)をReed-Muench法により求めた。結果を表-1および第1図に示す。図中、(1)、(2)および(3)はそれぞれポリヘキサメチレンパイガナジン塩酸塩の10000倍希釈区、20000倍希釈区、および40000倍希釈区を示し、(4)は対照区を示す。

-7-

感作させた。ポリヘキサメチレンパイガナジンの塩酸塩の希釈倍数は1250、2500、5000、10000倍であり、リン酸緩衝液を2mlと対照とした。

作用後、リン酸緩衝液と組織培養液で100倍希釈し、その0.1mlを培養した鶏胎児繊維芽細胞に接種し、細胞変性効果を観察し、50%感染量(TCID₅₀)をReed-Muench法により求めた。結果を表-2に示す。

表-2

作用時間		希 釈 倍 数				対 照
		1250	2500	5000	10000	
15分	TCID ₅₀ 減少率(%)	<10° >99.9	<10° >99.9	10° 99.2	10° 74.9	10° -
60分	TCID ₅₀ 減少率(%)	<10° >99.8	<10° >99.8	10° 99.2	10° 92.1	10° -

*ポリヘキサメチレンパイガナジン塩酸塩の

希釈倍率

実施例 3

ポリヘキサメチレンパイガナジンの塩酸塩(平

表-1

希釈倍率	ウイルス接触時間(分)					
	0	5	15	30	60	120
10000倍	10°	10°	≤10°	≤10°	≤10°	≤10°
20000倍	10°	10°	10°	10°	≤10°	≤10°
40000倍	10°	10°	10°	10°	10°	10°
対 照 区	10°	10°	10°	10°	10°	10°

* ポリヘキサメチレンパイガナジン塩酸塩の
希釈倍率

実施例 2

マレック病ウイルスの血清タイプ3型である七面鳥ヘルペスウイルス(以下、HVTウイルスと略す)に対する効果

HVTウイルス0.1株を10mlのリン酸緩衝液で希釈(1.2×10⁸PFU/ml)し、この液を原液とし、リン酸緩衝液で10、100、1000、10000倍希釈した。

このウイルス液0.2mlをポリヘキサメチレンパイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)の希釈液2mlに加え、15分または60分

-8-

均分子量900~1100)をリン酸緩衝液で10000倍に希釈し、この溶液2mlにILTウイルスSPL株の希釈液(102.8 TCID₅₀/0.1ml)0.2mlを加え、20℃、15分間感作させた。この感作液0.2mlをとり、リン酸緩衝液1.8mlに加え、感作液の10倍希釈液を得た。さらにこの10倍希釈液0.2mlをとり、リン酸緩衝液1.8mlに加え、感作液の100倍希釈液を得た。

感作液およびそれらの希釈液からそれぞれ0.1mlをとり、組織培養した鶏腎細胞に接種した。37℃で培養し、10日間、ウイルス感染による細胞変性効果を観察した。また、ポリヘキサメチレンパイガナジンの塩酸塩を含まないリン酸緩衝液2mlにILTウイルスSPL株の希釈液(10⁸ TCID₅₀/0.1ml)0.2mlを加え20℃、15分間感作させ、以下同様に操作し、対照とした。その結果を表-3に示す。

-9-

-45-

-10-

表-3

感作液	感作液の希釈倍数		
	× 1	× 10	× 100
10000倍*	-	-	-
対 照 (リン酸緩衝液)	+(3)	+(3)	+(5)

*ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の

希釈倍数

- ; ウイルス感染による細胞変性を認めず
 +; ウイルス感染による細胞変性を認める(右
 上かっこ内の数字は細胞変性を認めた培養
 日数)

この結果から、ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩のウイルス不活性化効果は、不可逆的であり、該化合物に較ウイルス効果のあることが証明された。

実施例 4

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)20重量%液を再蒸留水で1000、2000、4000および80

00倍に希釈した。

この溶液2mlにヘルペスウイルスtype II(SAV)のウイルス液0.2mlを混ぜ、20℃で静置する。また、再蒸留水2mlを取り同様に操作し対照とした。

15分、30分、45分および60分後に各感作液からサンプリングし、ブレイク・アッセイ(Plaque assay)により生後ウイルス量を定量化しウイルス減少量(%)として表した。結果を表-4および第2図に示す。

表-4

ウイルス減少率 (%)		希 釈 倍 数*				
		1000	2000	4000	8000	Cont.
感 作 時 間	15分	72.2	78.2	55.0	52.8	12.9
	30分	85	80.8	78.9	72.2	11.1
	45分	92	87.2	83.6	78.6	11.1
	60分	93.3	88.3	85.6	78.1	33.3

*ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の

20重量%液希釈倍数

-11-

実施例 5

豚伝染性胃腸炎ウイルス(以下、TGEウイルスと略す)に対する効果

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)20重量%液をリン酸緩衝液で500倍と1000倍とに希釈し、この溶液2mlにTGEウイルスKB株のウイルス液0.2mlを混ぜ、20℃の恒温槽中に静置し3時間感作させた。またリン酸緩衝液を2ml取り、同様に操作し、対照とした。

作用後、リン酸緩衝液と組織培養液で100倍希釈したものを豚胃腸炎細胞(LC-PK₂)に接種し4日間培養を行い、細胞変性効果の有無を観察した。結果を表-5に示す。

表-5

	希釈倍数*		対 照
	500	1000	
組織変性効果 の有無	-	-	+

*ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の

-12-

20重量%液希釈倍数

+: 細胞変性効果あり

-: 細胞変性効果なし

実施例 6

伝染性鶏ファブリキウス病ウイルス(以下、IBDウイルスと略す)に対する効果

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)20重量%液を再蒸留水で希釈し、薬剤希釈液1.5mlにウイルス液0.5mlを添加したときに薬剤が500倍希釈となるようにする。

薬剤希釈液1.5mlにIBDウイルスFK-78株のウイルス液0.5mlを混ぜ、20℃で静置し、15分間感作させた。また再蒸留水を1.5ml取り、同様に操作し、対照とした。作用後、リン酸緩衝液と組織培養液で100倍希釈したものを初代鶏胚線維芽細胞に接種し、7日間培養を行い細胞変性効果の有無を観察した。結果を表-6に示す。

-13-

-46-

-14-

表-6

	500倍希釈液*	対 照
細胞変性効果 の有無	-	+

*ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩

20重量%液の希釈液

+: 細胞変性効果の発現あり

-: 細胞変性効果の発現なし

実施例7鶏痘ウイルスに対する効果

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)20重量%液を再蒸留水で500倍に希釈し、この溶液2mlに鶏痘ウイルスNakano KⅢ株のウイルス液0.2mlを混ぜね20℃で静置し、15分間感作させた。また、再蒸留水を2ml取り、同様に操作し、対照とした。作用後、リン酸緩衝液と組織培養液で100倍希釈したものを初代鶏胚絨毛細胞に接種し、5日間培養を行い細胞変性効果の有無を観察した。結果を表-7に示す。

-15-

細胞変性効果の有無を観察した。1時間感作させた場合、細胞変性効果の発現がおこらなかった。

実施例9

本発明に用いられるポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の皮膚細胞に及ぼす細胞毒性と市販のウイルス不活化剤のそれとの比較を行った。

ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩20重量%水溶液をリン酸緩衝液と細胞培養液で1000倍、2000倍、4000倍および8000倍に希釈し被検液を調製した。

別に市販の代表的なウイルス不活化剤として、メチルドデシルベンジルトリメチルアンモニウムクロライドとメチルドデシルキシリレンビストリメチルアンモニウムクロライド(50重量%液)20gとポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル5gを100ml中に含む市販ウイルス不活化剤をリン酸緩衝液と細胞培養液を用いて1000倍、2000倍、4000倍および8000倍に希釈し、比較被検液を調製した。両被検液をヒト皮膚株化細胞NCTC2544に接種した。

-17-

表-7

	500倍希釈液*	対 照
細胞変性効果 の有無	-	+

*ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩

20重量%液の希釈液

+: 細胞変性効果の発現あり

-: 細胞変性効果の発現なし

実施例8鶏ニューカッスル病ウイルス(以下、NDウイルスと略す)に対する効果

ポリヘキサメチレンバイガナジンの塩酸塩(平均分子量900~1100)20重量%液を15%エタノール水溶液で希釈し500倍とした。この溶液2mlにNDウイルスTCND株のウイルス液0.2mlを混ぜ、20℃で静置し、15分、30分および1時間感作させた。

作用後、リン酸緩衝液と組織培養液で100倍希釈したものをヴェロ(Vero)細胞(アフリカミドリザル腎株化細胞)に接種し4日間培養を行ない、

-16-

接種後、37℃で培養を続け、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間および6時間後に各培養器中の培養液を除去し、細胞にトリパン青染色を行って鏡検に供した。一定範囲内の全細胞数と死細胞数を数え、次式により細胞生存率(%)を算出した。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{全細胞数}} \times 100$$

同様の試験をウイルス不活化剤を含まない被検液(対照)を用いて行った。結果を表-8に示す。

さらに、1000倍希釈と2000倍希釈での結果をそれぞれ第3図と第4図に示す。

ウイルス不活化剤の1000倍被検液に1時間接触させたヒト皮膚株細胞をトリパン青で染色したときの顕微鏡写真を参考写真1(対照)、参考写真2(ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩)および参考写真3(市販ウイルス不活化剤)に示す。死細胞は青く染色され、生細胞は染色されていない。

-18-

細胞と薬液希釈液との接触時間(hr)に対応する生存率(%)						
	0.25	0.5	1	2	3	4
希釈倍数						
	×1000	94	93	82	75	64
	×2000	94	93	94	88	81
	×4000	88	84	96	95	89
ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩	×8000	87	88	97	96	94
	×1000	34	17	0	0	0
	×2000	94	93	95	81	45
	×4000	96	95	97	93	94
他のウイルス不活化剤 A	×8000	87	86	92	97	89
		88	88	88	87	88
照 射						

-19-

の関係を示すグラフである。

第2図はヘルペスウイルスtype II に対するポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の効果を示すグラフである。

第3図と第4図はポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の皮膚細胞に及ぼす細胞毒性を示すグラフである

(1)はポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩の10000倍希釈区、(2)は同じく20000倍希釈区、(3)は同じく40000倍希釈区、(4)は対照区、(5)は1000倍希釈区、(6)は2000倍希釈区、(7)は4000倍希釈区、(8)は8000倍希釈区、(9)はポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩、(10)は市販ウイルス不活化剤をそれぞれ示す。

特許出願人 株式会社 上野製薬応用研究所
代理人 井理士 青山 保 ほか2名

-21-

実施例10

実施例9と同様にして、ウイルス不活化剤の10000倍希釈被験液を調製し、これにヒト皮膚細胞を接触させ、24時間後に培養細胞をメタノール固定し、常法によりギムザ染色を行った。その顕微鏡写真を参考写真4(対照)、参考写真5(ポリヘキサメチレンバイガナジン)および参考写真6(市販ウイルス不活化剤)に示す。

参考写真4～6はポリヘキサメチレンバイガナジンが殆ど皮膚毒性を有さないことを示している。

発明の効果

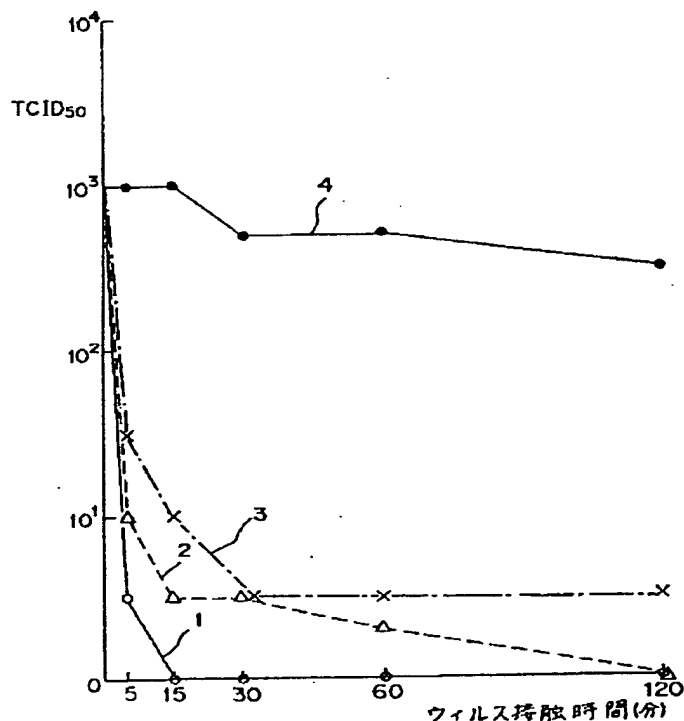
本発明によるウイルス不活化剤はヒトおよび動物に対して悪影響を及ぼすことなくウイルスを効果的に不活化させ、ウイルス性疾患を有効に予防する。特に、ヒトまたは動物の皮膚細胞に対する細胞毒性が低い。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1におけるILTウイルスと、ポリヘキサメチレンバイガナジン塩酸塩との20℃における接触時間(横軸)とTCID₅₀(縦軸)と

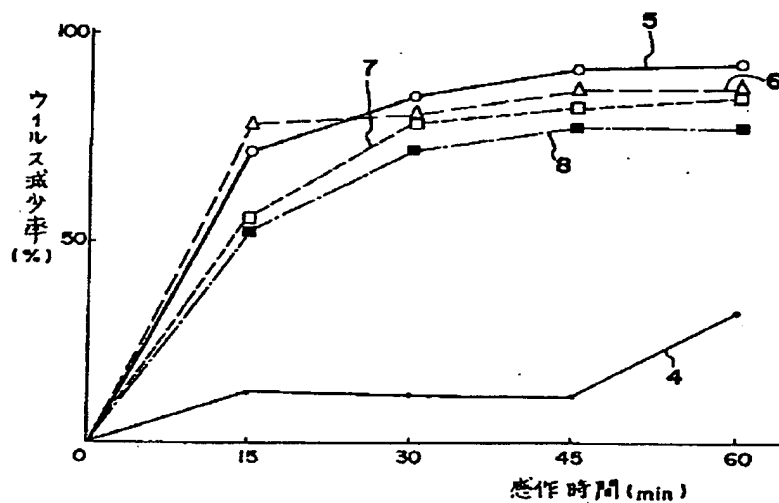
-20-

第1図

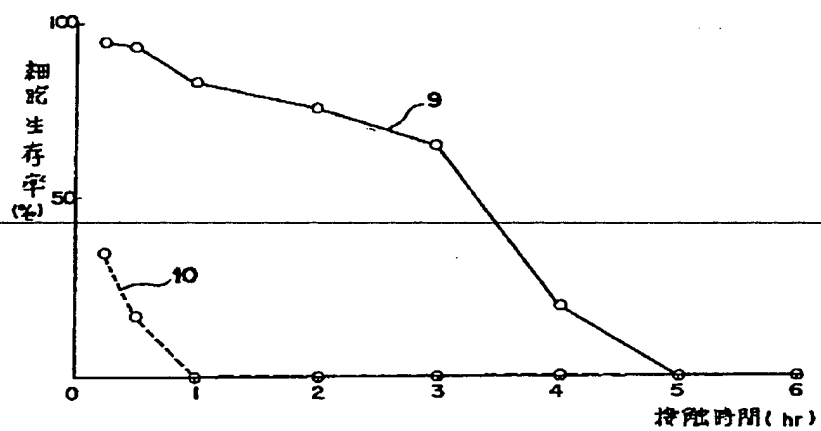


-48-

第 2 図



第 3 図



第 4 図

